

(1)

JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **2002171967**

(4) Date of publication of application: **18 06 02**

(51) Int. Cl.

G12N 5/06

C12M 1/00

C12M 1/00

// C12N 5/06 C12 1 91

(21) Application number: **2000371832**

(71) Applicant: **JAPAN SCIENCE TECHNOLOGY
CORP**

(22) Date of filing: **08.12.00**

(72) Inventor: **TA AGI MUTSUMI
YOSHIDA TOSHIOMI**

(54) **METHOD FOR IN VITRO CULTURE OF
HEMATOPOIETIC CELL GROUP**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a simple and effective method for culturing a hematopoietic cell group such as a hematopoietic stem cell, a hematopoietic precursor cell, etc.

SOLUTION: A substrate composed of a fabric is arranged in a medium. A stroma cell in a concentration of 1×10^2 – 4×10^5 cells/ml is inoculated into the medium and cultured. Then a hematopoietic cell in a concentration of 1×10^0 – 1.5×10^6 cells/ml is inoculated into the medium and cultured.

COPYRIGHT (C)2002 JPO

(10) 本国特許 (J.P.)

(12) 公

公

(A

(1) 特許願 番

2002 171967

2002 171967

(43) 日 平 14年6 1日(2002.6.18)

(51)I C

I

チ (参考)

C12N 5/06

C12M 1/00

C 4B029

C12M 1/00

3/00

A 4B065

3/00

C12R 1:91

/ (C12N 5/06

C12N 5/00

C12R 1:91)

C12R 1:91)

未請求 請求項の数5 ○ (全 5

(21)出 番号

-371832(P2000-371832)

(71)出 人 396020800

平成12 12月6日(2000.12.6)

県 市本 4 1番8号

(72)発 者 高木 睦

大阪 木市南春日E 5-1-55-211

(72)発明者 吉

大阪府大 市山田西2-4-A 1-505

(74)代 人 100093230

弁理 西郷 利夫

Fタ ム(参考) 4B029 AA02 BB11 CC02 DA10 DX10

CA03

4B065 AA93 BC41 CA44

(54) 明の

(57) 要

を $1 \times 10^4 \sim 4 \times 10^6$ cells/ml の度 接
培 し $1 \times 10^4 \sim 1.8 \times 10^6$
cells/ml 濃 で接種して)

【0004】 造血幹細胞移植法は、予り患者に大

1. $1.0^2 \sim 4 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ 濃度で
種 培養し、造血細胞群を $1 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ の 度で接種し、培養す 造血細胞群

細胞を $1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3 \text{ cells/ml}$ 濃度で接

り培養された造血細胞群のいずれかの造血細胞が、血液

【 頁5】請求 4の方法により、造される血液細胞

【 細な

【0001】

は、の出願の発明、骨、末梢、臍帯血などの少

【0002】

【従来の技術とその課題】 癌に 者、1990年
20万人であ、たか、2010年に
800万人に近づくと推計されており (Pisani, P., Pa
rkin, , ray, F., Ferlay, J., nt J. cancer 8
3, 18-29 (1999))、日本、でも1999年に、タ者
29万人を、た、り、生首、11年入

【0003】 癌の治療法としては、これまで、薬剤

い、れも治療効果と同一に、上、発、

程度、あるいはそれ、上に患者への負担が大きい、全身

いる、近年、骨髓と同様に末梢血中にも造血幹細胞が

の、要でないことから、臨床用が審み、行われている

【0005】 このような造血幹細胞移植法には、

と提供された細胞を用いる同種移植がある、自家骨髓移

植移植では、白血球型、が兄弟、と5%、両親や
親戚では1%以下と低く、に登録された血

20

らの提供に頼らざるを得、い場、い、ま
た、いずれの場合も提供者は、最低数日、入院する必要

上にも渡る骨髓の採、の大きな負担を余、なく

提供者への全身麻酔や、血は、必、ないものの、
末、中の造血幹細胞の含有率、通常は、な、り低いた
め、抗癌剤や、血球の増、り、さ、こす、て、明

投与は、提供者、対、て5日、以上、れるが、その長

は、分な量の、細胞を採取、患、に、植する、

1、外では臍帯血、クを通して行うが、られる細胞量
られて、るた、り、移植、能な患者は子、に見られて

【0006】 これら、問題を解決するため、近年、造
血幹細胞を提供者か、必要量採、するのではなく、

舌発に行われている、利、は、10、13697
8、す、き、10、295369においては、特定の、型
50 型、D34、ま、び、またはc、k、r、

血増殖因子を添してもよい。例えば、 $IL-1$ 、 $IL-3$ 、 $IL-6$ 、 MGF （ SCF ）、 $GM-CSF$ 、 $IL-3$ が選択される1-7サイトカイン（特表平6-508987）や $IL-1$ 、 $IL-3$ 、 $IL-6$ 、 E を組み合せ、 $IL-1$ 、 $IL-3$ 、 $IL-6$ 、 E （特表平5-502385）さらには、 $IL-3$ 、 $IL-2$ 、 SCF を組み合せたサイトカイン（特開平7-135969）の一種

【0020】この出願においては、まず、布を設けた培地にストロマ細胞を $1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$ cell

ト、ナル、ウシ、タヒツ、ウ、マウスなどの骨髓、脂肪、歯髄、血液等に由来する造血細胞、内皮細胞、脂肪細胞、マクrophage、

ては、接種された細胞は、培養により前記のとおり24時間の培養に付する。ストロマ細胞を増養する条件は、ストロマ細胞の接種密度が $1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$ cells/

によれば、接種密度が 1×10^2 cells/ml未満でも、 4×10^3 cells/mlより多くても、造血細胞は、増殖し、その条件は、上記のとおり種々の

れ、温度を選択すればよい。例えば、温度は、 $20 \sim 39^\circ C$ 、または $33 \sim 37^\circ C$ とすることがあ

【0021】この出願の発明の造血細胞群の体外培養方法に、ストロマ細胞を培養した第1に、さらに造血細胞を $1 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^3$ cells/mlの濃度

【0022】この出願の発明において、「造血細胞群」とは、再生可能な造血幹細胞と造血幹細胞から生じた造血細胞を指す。このとき、造血前駆細胞とは

骨髄、前駆細胞、前駆細胞などを含む

前駆細胞であるが、厳密に知ることはほとんど不可能で

て「造血細胞群」と呼ぶ。つまり、この出願の発明の造血細胞群の培養法については、原料となる造血

D34陽性細胞に精製した細胞等が例えられる。

【0023】この出願の発明の造血細胞群の体外培養方法によつて得られた造血細胞群は、そのままの状態、あ

【0024】この出願の発明の造血細胞群の体外培養方法によつて得られた造血細胞群は、そのままの状態、あ

20 る不純物の除去をおこなった後、さらには、種々の

な操作をおこなうものである。好ましくは、感染症等の予防のためにも、精製された状態のものを、凍結あるいは凍結乾燥して保存する。このような造血細胞群は、患者の体内において移植に用いられ

【0025】この出願の発明では、上記のとおり、血

し、ストロマ細胞を $1 \times 10^2 \sim 4 \times 10^3$ cells/mlの濃

血細胞群を $1 \times 10^2 \sim 1.8 \times 10^3$ cells/mlの濃度で接種し、培養すれば、造血細胞群を体外培養することができる。このようにして得られた造血細胞群は、前記の

【0026】さらに、この出願の発明では、上記のとおりが分化され、得られる。ここで、「血液細胞」とは、造血幹細胞から分化した血球まで、すべての造血細胞を

骨髄球、前駆細胞、好中球、好塩基球、Tリンパ球、Bリン

れる。

【0027】この 髄の発明乃血液細 の 法に

要 胞の除去をおこった後、 ちには、種々の未知の
方法による必要細胞の精 造 子導入等の必要な操作

人、輸血　とし　保子されて　よ

【0028】 例を示し、この の 施 形

は以下の 1) に限定されるものではない。附 いて、様々な異様、可能であることは言つまでもない。

【0029】

【実施例】 実施 1 魚細胞用 12 ト
(3.6cm² SHIMLON MS-80120R)
に 飼 体 4 枚 (NBS 社 製 Fibracel、
リスステール、直径 6mm、厚さ 0.7mm の 盤 状)
を 敷 き、ウシ胎児血清 10% 含 る RPMI 1640 培 地
を 用 い て、ウスストロマ細 胞 ST (理 胞 銀 R
CB224) 液 3ml (接 種 濃 度 3.9×10^5 cells/ml)、37℃、5% CO₂ の 雰 気 下

【0030】接着培養用12ハフボード (3 × 6 cm²)
SUMILON MS 80120 (シリコン底面に不

＊織布を敷かずに同様の糸でマウススト

5 T

【0031】この後、各ウェルの 清を、り除、マウス (Ba1b/c、8、12週齢、オ) の大 骨お

(1 mM)、ウー胎児血 (12.5%)、ウー血清 (12.5%) を含む $M_{12}Co_{55}A$ 粉末培土 (GIBCO BRL) で 5×10^4 cells/ml の濃度で各ウェルにえ、液 3 ml、33°C、5% CO_2 雰囲気下、1 週間培養した。

【0032】1 番に含まれる 糖 包を(L、0)

を測定するとともに、メチルセルロース培地（ス・セル
クロー社、Methocult GF M3434）を用いてコロニー形成

より造血細胞中の前 B 細胞 (CFU-Mix) の割合

【0033】造血細胞の細胞の割合を
ることにより前駆細胞の増殖を計測した

【0034】表1に培養前後の造り細胞密度を、前駆細胞 (C) (x) 密度とした。

【0035】

【表 1】

日 日	10 / m	10 / m
0	50	3
	32	288
シ ル	05	05

胞 後7 間の培養によって造血細胞や、前駆細胞 (CFU-Mix) 密度ともに増減したが、

培養では造血細胞密度は少し減少するものの、前駆細胞密度が13倍になり、前駆細胞の比率は2.5倍増えた。

【0036】

ら、この発芽により少 の造血幹 から大量の造血

治療法としての応用も可能となる。